

**Zur Bestimmung kleiner ACTH-Quantitäten
mit Hilfe des Corticosteronanstiegs
im Nebennierenvenenblut der mit
Dexamethason hypophysenblockierten Ratte**

Klaus Friedrich Kopp

1964

Aus der Abteilung für Klinische Endokrinologie
(Leiter Prof. Dr. med. E. F. Pfeiffer)
der I. Medizinischen Universitätsklinik zu
Frankfurt am Main
(Direktor : Prof. Dr. med. F. Hoff)

Zur Bestimmung kleiner ACTH-Quantitäten mit Hilfe
des Corticosteronanstiegs im Nebennierenvenenblut
der mit Dexamethason hypophysenblockierten Ratte.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Klaus Friedrich K o p p
aus Rockenhausen/Pfalz

Frankfurt am Main 1964

Dekan : Prof. Dr. J. Frey

Referent : Prof. Dr. E. F. Pfeiffer

Korreferent : Prof. Dr. H. J. Schümann

Tag der mündlichen Prüfung : 31. August 1964



MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Herrn Professor Dr. med. E. F. Pfeiffer danke ich für die Überlassung des Themas und für die bei der Arbeit gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. med. Klaus Retiene danke ich besonders für seine fortwährende freundliche Hilfe und Leitung bei den Versuchen und Frau Nierle für wertvolle technische Assistenz.

Zu Dank verpflichtet bin ich ferner der Standard-Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft Göttingen, Leiter Prof. Dr. Dr. W. Koll; Dr. C.J. O'Donovan, vorm. The Upjohn Co. Kalamazoo, Michigan, U.S.A., Prof. Dr. H. Molitor, Sharp & Dohme Research Lab. Rahway, N.J., U.S.A. sowie der Firma E. Merck AG, Darmstadt, die uns in großzügiger Weise ACTH-Präparate und Dexamethason zur Verfügung stellten.

DISPOSITION

I.	<u>Einleitung</u>	Seite 1
	<u>Historischer Überblick</u>	" 1
II.	<u>Eigene Untersuchungen</u>	12
A)	<u>Allgemeine Versuchsanordnung</u>	
	ACTH-Bestimmung anhand des Corticosteron-Anstieges im Nebennieren-Venenblut der Ratte nach Hypophysen- Hemmung mit Dexamethason:	
	1) Einmalige Hemmung.....	12
	2) Viermalige Hemmung.....	12
	3) Operative Hypophysektomie.....	13
	4) Messung des Corticosterons.....	13
B)	<u>Methodik</u>	
	1) Dexamethason-Blockade.....	14
	2) Hypophysektomie.....	14
	3) Nebennieren-Venen-Kanulierung.....	15
	4) Corticosteron-Messung.....	18
	5) Berechnung der Ergebnisse.....	19
III.	<u>Ergebnisse</u>	
	1) Corticosterongehalt im Nebennieren-Venenblut nach einmaliger Hypophysenblockade mit Dexamethason	20
	2) ACTH-Effekt auf den Corticosterongehalt des NNV-Blutes nach 4-maliger Dexamethasonblockade	20
	3) ACTH-Effekt auf den Corticosteron-Gehalt des NNV-Blutes nach operativer Hypophysektomie	21
IV.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	22
V.	<u>Zusammenfassung</u>	25
VI.	<u>Abbildungen</u>	27
VII.	<u>Literaturverzeichnis</u>	30
VIII.	<u>Lebenslauf</u>	37

I. EINLEITUNG

Das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), welches die verschiedenen Funktionen des Stoffwechsels reguliert, gilt als das wichtigste Hypophysenvorderlappen-Hormon für die Ernährung des Lebens. Sein spezifischer Angriffspunkt ist die Nebennierenrinde. Der Nachweis aus den Körperflüssigkeiten ist besonders am Menschen bei hormonellen Erkrankungen von Bedeutung, doch sind die zur Zeit vorhandenen Bestimmungsmethoden wegen des Aufwandes und der relativen Ungenauigkeit zur allgemeinen Diagnostik nicht zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, ACTH im menschlichen Blute zu messen und eine ausreichende Meßempfindlichkeit anhand der Bestimmung des Corticosterons im Nebennieren-Venenblut der mit Dexamethason hypophysenblockierten Ratte zu erreichen.

HISTORISCHER ÜBERBLICK

Aus der geschichtlichen Betrachtung ist zu entnehmen, daß im Vergleich zum allgemeinen Stand der biologischen Forschung die Bedeutung der humoralen Korrelation der Organe lange nicht erkannt wurde. 1855 prägte Claude Bernard den Begriff der inneren Sekretion im Gegensatz zur äußeren Sekretion der Drüsen mit Ausführungsgängen. Die anatomischen und physiologischen Grundlagen waren 1830 von Johannes Müller unter Bezug auf Malpighi (1686) gelegt worden. Er unterschied die Begriffe Exkretion und Sekretion von Stoffen mit spezifischer Wirkung und teilte diese Funktionen jeweils den Drüsen mit und ohne Ausführungsgang zu. Die Ergebnisse des Göttinger Physiologen Berthold, der 1849 aufgrund von Reimplantationsversuchen die Folgen der Kastration von jungen Hähnen auf das Fehlen der Hodensekretion zurückführte, blieben

lange ohne Widerhall, ähnlich wie lange vor ihm die Auffassungen von Bordeu in Montpellier (1775). In Analogie zu den post-mortem-Befunden an den Nebennieren des Menschen, die Addison (1855) bei der nach ihm benannten Krankheit erhob, stellte Brown-Séquard (1856) die in kurzer Zeit tödliche Folge der Nebennierenentfernung bei Tieren fest, die jedoch auf das Fehlen des chromaffinen Gewebes (Henle (1865)) im Markanteil der Nebennieren zurückgeführt wurde. Zwar gab derselbe Forscher 1889 als 72-jähriger durch Selbstversuche mit Stierhodenextrakten, die wegen der angeblich verjüngenden Wirkung beträchtliches Aufsehen erregten, der Endokrinologie einen wesentlichen Impuls, doch wurde der Beweis für die Lebenswichtigkeit der Rindenfunktion in den Nebennieren erst 1913 von dem Prager Physiologen Biedl erbracht, der bei Teleostiern und Selachiern das vom Markorgan anatomisch gesonderte Interrenalorgan, aus dem phylogenetisch die Nebennierenrinde hervorgeht, entfernte. Die Zusammenhänge zwischen der Nebenniere und der von dem Frankfurter Gelehrten Soemmering (1778) als Hypophyse bezeichneten Hirnanhangsdrüse waren durch klinische wie durch experimentelle Beobachtungen schon bald nach den Anfängen endokrinologischer Forschungen erkannt worden. 1894 beobachteten Oliver und Schäfer gleiche blutdrucksteigernde Eigenschaften von Extrakten aus Hypophysen und aus Nebennieren. Hierfür waren allerdings die Wirkstoffe des Hypophysenhinterlappens (Howell (1898)) und des Nebennierenmarkes verantwortlich. Erst 1930 konnte Ph.E. Smith zeigen, daß durch Implantation von Hypophysenvorderlappen die nach Hypophysektomie bei Ratten eintretende Atrophie der Nebennierenrinde zu verhindern ist. Die Existenz eines adrenocorticotropen Hormons (ACTH) unter den Hormonen des Hypophysenvorderlappens war endgültig bewiesen, als die Autoren Collip, Anderson und Thomson (1933) mit Reinpräparaten des Hormons die vollständige Regenera-

tion der atrophierten Nebennierenrinde bei der hypophysektomierten Ratte erzielen konnten. Unabhängig davon waren Anselmino und Hoffmann (1934) zu den gleichen Ergebnissen gekommen. Die späte Anerkennung und Einordnung der gegenüber der nervalen phylogenetisch älteren humoralen Regulation als Bestandteil der Steuerungseinrichtungen im Organismus resultierte aus der anfangs vorwiegend morphologischen Ausrichtung der biologischen Forschung, von der das humorale Prinzip nicht ohne weiteres zu erfassen war. Die besonderen Schwierigkeiten, die sich der Hormonforschung entgegenstellten, bestehen auch heute noch unverändert weiter. Eigentümlich für das System der Drüsen mit innerer Sekretion ist die species-unabhängige Einseitigkeit der Baupläne, der chemischen Konstitution der Hormone und damit die Artunabhängigkeit der Wirkung. Die stammesgeschichtliche Weiterentwicklung der Warmblüter, die der fortschreitenden Hirnentwicklung folgt, ist jedoch auch, wie die vergleichende Anatomie zeigt, von einer weiterschreitenden Differenzierung des humoralen Steuerungssystems begleitet. Hierbei ist die Tendenz zur Verflechtung und Wechselwirkung mit dem vegetativen und Zentralnervensystem erkennbar. Die Abgabe des ACTH ins Blut wird humoral und neural gesteuert. Humoral durch die Nebennierenrinden-Hormone (Sayers (1950)), neurohumoral bei Sympathikusreizung durch das Adrenalin (Long (1943)) und neural über hypothalamische Kerngebiete (Colfer et al. (1950), de Groot und Harris (1950), Harris (1952)), die Osmotransmitter (ACTH-releasing-factors, ARF, CRF, Guillemin (1955)) in die Portalgefäße der Hypophyse einführen (Lunson und Briggs (1955), Schmid et al. (1955)).

Die physiologischen Wirkungen von ACTH werden zusammenfassend in der Fähigkeit veranschaulicht, die nach Hypophysektomie auftretenden morphologischen Veränderungen der Nebennierenrinde wieder rückgängig zu machen. In der

Zona fasciculata der Nebennierenrinde entsteht während der Atrophie eine breite sudanophile Zone, die unter ACTH-Einfluß wieder sudanophile Granula einlagert. Die Änderung des Stoffwechsels in der Nebennierenrinde ist besonders von einem Cholesterin- und Ascorbinsäureschwund nach ACTH-Gabe begleitet, welcher in engem Zusammenhang mit der Steroidproduktion steht. Inwieweit hierbei die Anfangs- oder Endsynthese oder die Ausschüttung der Steroide betroffen sind, ist noch nicht ganz geklärt. Langdauernde ACTH-Zufuhr führt zu einer funktionellen Hypertrophie der Nebennierenrinde. Extra-adreno-corticale Wirkungen (Engel und Engel (1956)) auf andere endokrine Drüsen und auf den Stoffwechsel schreibt Sulman (1952) dem ACTH selbst zu, während sie Astwood (1955) auf Verunreinigungen zurückgeführt.

Die Aufklärung der chemischen Konstitution des ACTH führte zu zwei verschiedenen Polypeptiden mit adrenocorticotroper Wirksamkeit, Corticotropin-A, das aus nicht hydrolysiertem Material (White (1953)) und Corticotropin B, das aus hydrolysiertem Material gewonnen wird (Bazemore (1953)). Corticotropin-B ist möglicherweise ein Derivat von Corticotropin-A und besteht aus 39 linear angeordneten Aminosäuren, deren Sequenz bekannt ist. Es hat das Molekulargewicht 4566. (Ph. Bell (1955), White und Landmann (1954), Ch. Li et al. (1955), Hofmann und Jöhl (1955)). Die Benennungen α -Corticotropin und β -Corticotropin beziehen sich auf die Herkunft von Rind und Schaf bzw. vom Schwein. Sie sind im wesentlichen mit Corticotropin-A und -B identisch, die sich durch die chemische Darstellungsmethode unterscheiden. Als erstes synthetisches Präparat mit adrenocorticotroper Wirksamkeit wurde ein Nonadecapeptid dargestellt, in dem die Sequenz von 19 Aminosäuren, ausgehend von der endständigen Aminogruppe, mit derjenigen von Schaf- Schweine und Rinder-ACTH übereinstimmte (Ch. Li et al. (1960), Boissonnas et al. (1956), Hofmann et al. (1959))

Schwyzler et al. (1960)). Die üblichen Handelspräparate werden jedoch nach wie vor aus tierischen Hypophysen durch Eisessigextraktionen und Adsorption an Oxycellulose isoliert (Astwood (1951)). Sie enthalten im wesentlichen Corticotropin-A mit einem Molekulargewicht von 20 000. Elektrophoretisch und in der Ultrazentrifuge erweisen sie sich als einheitliches Eiweiß, sind jedoch bei peptischer Verdauung und bei Säurehydrolyse stabil, so daß ein Trägereiweiß angenommen werden muß, von dem das aktive Polypeptid jedoch präparativ schwierig abzutrennen ist. Zur Identifizierung des Hormons stehen außer der vergleichenden Elektrophoresis und Endgruppenanalyse noch keine einfachen chemischen Methoden zur Verfügung. Die biologische Wirksamkeit ist daher der einzige Hinweis auf das Vorhandensein oder Fehlen des Hormons in einer Fraktion bei der Darstellung aus Organextrakten. Die biologischen Methoden konnten bei den Steroidhormonen der Nebennierenrinde nach Aufklärung der chemischen Konstitution durch chemische ersetzt werden und der Wirkstoff in absoluten Gewichtseinheiten angegeben werden. Die vorliegende Arbeit fußt auf der Kombination beider Verfahren.

Die Bestimmung und Titration von ACTH stützt sich auf einen charakteristischen Effekt des Hormons im Organismus, der in einem biologischen Versuch quantitativ gemessen wird. Definitionsgemäß sind Hormone Stoffe, die in einer Drüse gebildet, direkt oder indirekt über die Lymphe in die Blutbahn abgesondert werden und an einem von der Bildungsstätte entfernten Ort eine spezifische Wirkung entfalten (Starling (1905)). Die Gewichtszunahme der Nebennieren, sowie das Auftreten histologischer und biochemischer Veränderungen nach Verabfolgung von ACTH wurden als Bestimmungsmethoden angegeben. Da eine ganze Anzahl von Stoffen wie Peptone, Proteine, Ammoniak, Morphinum etc. (Teppermann, Engel und Long (1943))

durch Mobilisierung von körpereigenem ACTH eine Hyperplasie der Nebennierenrinde bewirken, können nur hypophysektomierte Tiere benutzt werden. Die Wertigkeit der verschiedenen Testmethoden ist jedoch recht unterschiedlich. Gleiche ACTH-Präparate führen beispielsweise im Collip'schen Nebennierengewichtstest verglichen mit der Ascorbinsäuretest-Einheit von Sayers zu anderen Ergebnissen. Dies hat zur Annahme von verschiedenen ACTH-Faktoren geführt (adrenal weight factor, AWF, adrenal growth factor, AAF) Rerup (1961)). Ebenso scheinen bei klinischer Anwendung hochgereinigte ACTH-Präparate pro mg mehr als die 100-fache Wirkung der Standard-Einheit zu erreichen, während sie im Sayerstest an der Ratte nur 40-mal so wirksam sind.

Seit einigen Jahren existiert ein Internationales Standard-Präparat von ACTH. Ursprünglich diente ein Li-Sayers-Präparat (Armour La I A) zum Vergleich. 1 mg davon entsprach 1 iE (UNO 1951). Neuerdings werden die Präparate wegen Erschöpfung der Vorräte aus dem ersten Standard nach dem Second-USP-Standard-1955, identisch mit dem Second-International-Standard-1955, eingestellt. Die Titration erfolgt mit einem modifizierten Sayers-Ascorbinsäuretest (Subcutaneous-Adrenal-Ascorbic-Acid-Depletion-Method, Rerup (1958)). 1 mg natürliches Schweine-ACTH entspricht hierbei 1,14 iE ACTH. Dieser Standard ist nur für ACTH-Protein und nicht für ACTH-Peptide (ACTP) als Vergleichspräparat zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich nach diesem Standard eingestellte Präparate zur Eichung verwandt.

In der Reihenfolge der Bestimmungsmethoden gestattete als erstes der Reparationstest von Simpson, Evans und Li (1943) quantitative ACTH-Messungen. Infantile, 14 Tage zuvor hypophysektomierte Rattenweibchen erhalten 4 Tage lang Injektionen der zu prüfenden ACTH-Lösung.

24 Stunden nach der letzten Injektion werden die Nebennieren gewogen und histologisch auf die Lipoidverteilung untersucht. Der Erhaltungs-Test aus der gleichen Arbeitsgruppe (Astwood und Tyslowitz (1942)) war hinsichtlich der Genauigkeit etwas befriedigender, doch als Routine-methode wegen der erforderlichen Zahl der Versuchstiere und der großen Hormonmengen wenig brauchbar. 15 bis 25 juvenile Rattenmännchen erhielten unmittelbar nach Hypophysektomie während 15 Tagen täglich die Prüflösung intraperitoneal injiziert. Als Einheit wurde die tägliche ACTH-Dosis berechnet, die das Nebennierengewicht auf dem Voroperationsniveau erhielt.

Als offizielle Standardisierungsmethode für ACTH der British Pharmacopeia 1955 diente der Thymus-Involutions-Test (Bruce et al. (1952), Hayashida und Li (1952)), wobei die Verkleinerung des Thymus bei jungen Ratten durch Schwund der Thymocyten als Maß für die hormonale Aktivität von injiziertem ACTH herangezogen wurde. Empfindlicher und schneller ist die von Sayers, Sayers und Woodburry (1948) angegebene Ascorbinsäuremethode. Sie beruht auf der Eigenschaft des Hormons, den Vitamin-C-Gehalt der Nebennieren vorübergehend stark zu senken. Hypophysektomierte Rattenmännchen von 120 - 160 g werden nach 21 bis 27 Tagen linksseitig adrenaletomiert. Anschließend erhalten sie via Schwanzvene die ACTH-Testlösung und nach 1 Stunde wird die rechte Nebenniere entfernt. Im Vergleich zur linken Nebenniere wird der Gewichtsverlust und der Ascorbinsäureschwund bestimmt. Zwischen dem Ascorbinsäureschwund und dem Logarithmus der ACTH-Dosis besteht keine geradlinige Beziehung im Bereich von 0,15 bis 2,5 mE eines hochgereinigten ACTH. Eine wesentliche Empfindlichkeitssteigerung des Sayers-Test erreichten Munson und Toepel (1958), indem sie anstelle des Abfalls der Ascorbinsäure im Nebennierengewebe den Anstieg der Ascorbinsäure im venösen Nebennierenblut bestimmten. Die Anwendbarkeit wurde jedoch durch operative Schwierigkeiten eingeschränkt. Ein Test am Menschen, der ursprünglich von Thorn (1948) beschrieben wurde, beruht.

auf der Feststellung des "Eosinophilensturzes" durch Zählung der eosinophilen Leukozyten vor und 2 bis 4 Stunden nach ACTH-Injektionen (Ogryzlo und Gornall (1953)). Der Test ist wenig empfindlich und gestattet kaum quantitative Aussagen.

Mit dem Ziel, sowohl empfindlichere als auch spezifischere Testmethoden zu finden, wurden verschiedene Corticoidhormon-Tests ausgearbeitet, die die eigentlich physiologische ACTH-Wirkung, nämlich die Hormon-Sekretion der Nebennierenrinde erfassen. Nach den Untersuchungen von Bush (1953, 1955) und Nelson (1951) sind im Blut von verschiedenen Tierarten stets nur Corticosteron, Hydrocortison und Aldosteron vorhanden. Das gegenseitige Verhältnis wechselt von Art zu Art. Bei der Ratte wird überwiegend Corticosteron produziert. Der Corticosteron-Anstieg im Nebennieren-Venenblut der Ratte nach ACTH-Gabe erwies sich quantitativ unterschiedlich von der Wirkung gleicher Chargen im Ascorbinsäuretest oder Nebennierengewichts-Test, die wie eingangs erwähnt untereinander divergieren (Lipscomb pers. Mitteilungen, Hedner und Rerup (1962)).

Der In-vitro-Test von Saffran und Schally (1955) benutzt als Maß für die ACTH-Aktivität die von inkubiertem Nebennierenrindengewebe in vitro produzierten Corticoide. Nelson und Hume (1955) ermittelten im Nebennieren-Venenblut von hypophysektomierten Hunden den Anstieg von 17-Hydroxy-Corticosteron nach Injektion von Testlösungen und bestimmten ACTH-Mengen von 1,0 bis 10,0 mE. Die Größe des Versuchstiers erlaubt es, 20 bis 30 ml menschliches Plasma pro Injektion zu verwenden und Kontrollwerte und Standards und mehrere Unbekannte an einem Versuchstier zu messen. Die Entwicklung von Mikromethoden zur Erfassung kleinster Mengen von Nebennierenrinden-Hormonen machte die Messung dieser Hormone im peripheren wie im Nebennieren-Venenblut der Ratte möglich (Zenker und Bernstein (1958), Silber, Bush und Oslapas (1958), Sweat (1954)).

Guillemin et al. (1957) bestimmten ACTH, welches an anderen Versuchstieren durch Hypothalamusextrakte freigesetzt worden war, indem sie den Anstieg des Corticosterons im peripheren Blut einer großen Zahl hypophysektomierter Ratten feststellten. Die Nachweisbarkeit von 0,05 mE ACTH an der hypophysektomierten Ratte gaben Lipscomb und Nelson (1959) an, wenn der Anstieg des Corticosteron nach intravenöser Zufuhr von ACTH im Nebennieren-Venenblut gemessen wurde.

Ifeiffer und Mitarbeiter (1960) konnten zeigen, daß die Bestimmung von ACTH an der Ratte anhand des Corticosteron-Anstiegs im peripheren Blut auch nach medikamentöser Hemmung der ACTH-Eigenproduktion in der Rattenhypophyse mit Dexamethason anstelle der operativen Hypophysektomie möglich ist (vgl. Hodges (1955), Verne (1959), Hamburger (1960), Koller (1960)). Das Corticosteron wurde nach Chloroformextraktion aus dem Plasma aufgrund seiner mit Schwefelsäure induzierten Fluoreszenz photometrisch gemessen. Dexamethason, 9-Alpha-fluoro-16-alpha-Methyl-Prednisolon, weist keine Eigenfluoreszenz auf, weshalb es die Messung des Corticosterons nicht stört. Die ratteneigene hypophysäre ACTH-Sekretion wird durch das Steroid Dexamethason entsprechend der Selbststeuerung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems gehemmt (Sayers (1950), Tuchmann und Duplessis (1954)), da sowohl endogene wie exogene Corticoide eine Zügelung der Hypophysenfunktion bewirken (Sydnor (1955)). Als Abkömmling des Hydrocortison besitzt Dexamethason an C-11 die charakteristische Hydroxylgruppe, die zur Regulierung der ACTH-Sekretion notwendig ist. Seine ACTH-blockierenden Eigenschaften spiegeln sich in dem Abfall des ratteneigenen Plasmacorticosterons wieder, das seinen Tiefstwert zwischen 6 und 8 Stunden erreicht, um dann langsam wieder zu normalen Werten anzusteigen (Vaubel (1961)). Dieser Abfall bewegt sich

zeitlich und größenordnungsmäßig im Bereich dessen, was nach operativer Hypophysektomie im Nebennieren-Venenblut gefunden wurde (Abb. 1). Zum Zeitpunkt der maximalen Hemmung der Rattenhypophyse wurden mittels eines Polyvinyl-Katheters aus der V. jugularis communis vor und nach Gabe verschiedener ACTH-Mengen zwei Blutproben entnommen. Nach Abzentrifugieren des Plasmas wurde das Corticosteron nach Zenker und Bernstein (1958) unter Adaptation der Methode an das Fluoreszenz-Zusatzgerät des Photometers Eppendorf bestimmt. Zwischen dem Logarithmus ACTH-Dosis und dem Anstieg des Plasma-Corticosterons ergab sich im Bereich von 0,1 bis 1,0 mE ACTH eine lineare Beziehung, wobei der Regressionskoeffizient unabhängig von der Höhe des variablen Ausgangswertes des Corticosterons war. Somit war aus dem peripheren Blut einer Ratte durch Feststellung eines Corticosteron-Anfangs- und Anstiegswertes eine unbekannte ACTH-Aktivität im Bereich von 0,1 bis 5,0 mE zu ermitteln (Anstieg der Kurve $b = 12,2$, Genauigkeitsindex $1 = 0,28$).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit basieren auf der geschilderten Bestimmung von ACTH anhand des Corticosteron-Anstiegs im peripheren Blut an der Dexamethason-blockierten Ratte von Pfeiffer, Ditschuneit, Berg, Retiene Vaubel (1960), deren Empfindlichkeit nicht ausreicht, um den ACTH-Spiegel im nativen Blut oder Plasma von gesunden Menschen zu messen. Die Messung im Nativblut ist deshalb zu erstreben, weil alle Methoden der Anreicherung oder Isolierung des Hormons eine quantitative Änderung seines corticotropen Effektes in sich bergen (Paris et al. (1959), Moruzzi (1954)). Der normale ACTH-Spiegel im peripheren Blut des Menschen soll infolge der physiologischen Zügelung der Hypophyse durch Cortisol etwa 0,5 bis 1,0 mE pro 100 ml Plasma betragen (Sydnor et al. (1953), Fujita (1957)). Der normale ACTH-Spiegel im peripheren Blut der Ratte wurde von Sydnor (1955) auf 0,5 mE pro 100 ml Plasma

geschätzt. Da man einer Ratte höchstens eine Testmenge von 2 bis 5 ml Plasma intravenös injizieren kann, wäre eine Nachweisgrenze von 0,025 mE pro ml Plasma erforderlich. Wie schon früher erwähnt, konnten Lipscomb und Nelson (1959) 0,05 mE ACTH an hypophysektomierten Ratten nachweisen. Unter Voraussetzung annähernd gleicher Aktivität von exogenem und endogenem ACTH muß somit der prozentual etwas höhere ACTH-Gehalt in 1 bis 2 ml menschlichem Nativplasma an der Ratte bestimmbar sein. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit versucht, durch direkte Messung des gesamten Corticosterons, das in 10-Minuten-Abständen im Venenblut der linken Nebenniere einer Ratte erscheint und dessen Menge dort 20 bis 40-fach höher als in der Peripherie ist (Vaubel (1961)), auch die Schwankungen nach kleinsten ACTH-Dosen zu erfassen. Zur Ausschnaltung der Rattenhypophyse wurde die medikamentöse Hemmung mit Dexamethason unter Vergleich der Ergebnisse mit denen nach operativer Hypophysektomie benutzt. Die Dexamethason-Blockade der Rattenhypophyse erschien wegen der technischen Einfachheit besonders geeignet.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A) Allgemeine Versuchs-Anordnung

ACTH-Bestimmung anhand des Corticosteron-Anstieges im Nebennieren-Venenblut der Ratte nach Hypophysen-Hemmung mit Dexamethason

1) Einmalige Hemmung

In einer ersten Versuchsserie wurde 11 männlichen Albino-Ratten einmal je 1 mg Dexamethason injiziert. 6 Stunden nach der Injektion, zum Zeitpunkt der maximalen Hypophysenhemmung, wurde zweimal hintereinander während 10 Minuten mittels eines Katheters das venöse Blut aus der linken Nebenniere gesammelt und der jeweilige Corticosterongehalt aus dem Plasma der beiden Blutvolumina bestimmt.

Die Kontrolle der hypophysären Hemmwirkung einer einmaligen Dexamethasongabe wurde an 5 ungehemmten Tieren unter gleichen Operationsbedingungen durchgeführt, bei denen ebenfalls die Corticosteron-Ausschüttung einer Nebennierenrinde in zwei aufeinanderfolgenden 10-Minuten-Abständen gemessen wurde.

2) Viermalige Hemmung

In der zweiten Serie wurden 18 Tiere vom gleichen Stamm und vom gleichen Gewicht wie in der ersten Serie über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 4 Einzelinjektionen von je 0,5 mg Dexamethason in regelmäßigen Abständen behandelt. 6 Stunden nach der letzten Injektion wurde wiederum die Katheterisierung der linken Nebennieren-Vene dieser Tiere vorgenommen und das ausfließende Blut in jeweils zwei aufeinanderfolgenden 10-Minuten-Portionen gesammelt. Nach der

als Basiswert entnommenen ersten Blutportion wurden ACTH-Mengen von 0,1 mE bis 1,0 mE intravenös zugeführt. Zur Kontrolle des Corticosteron-Anstiegs nach ACTH-Gabe dienten 6 Tiere, bei denen zwischen erster und zweiter Blutentnahme kein ACTH gegeben wurde.

3) Operative Hypophysektomie

Die dritte Versuchsserie diente zum Vergleich der medikamentösen Hypophysen-Hemmung durch Dexamethason mit der operativen Hypophysektomie. An 11 hypophys-ektomierten Albino-Ratten wurde die linke Nebennieren-Vene katheterisiert und wie in den vorangehenden Serien Blut entnommen. 8 Tiere erhielten zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme intravenös ACTH in Mengen zwischen 1,0 und 0,1 mE. 3 Kontroll-Tiere erhielten kein ACTH zwischen den Abnahmen von Basiswert und Anstiegswert.

4) Messung des Corticosterons

Nach der Operation der Tiere wurde nach dem Verfahren von Zenker und Bernstein (1958) das Corticosteron aus dem abzentrifugierten Plasma der beiden Blutvolumina für Basiswert und Anstiegswert extrahiert. Nach Kopplung des Corticosterons mit dem Fluoreszenzreagens wurde die Fluoreszenz mit dem Fluorometerzusatzgerät des Photometers Eppendorf gemessen. Der Anstieg des Corticosterons wurde in Abhängigkeit von den zugeführten ACTH-Mengen in semilogarithmischem Maßstab aufgetragen und eine Eichkurve zur Bestimmung unbekannter Mengen von ACTH aufgestellt.

B) Methodik

1) Dexamethason-Blockade

Zu den Versuchen wurden 200 bis 240 g schwere, männliche Albino-Wistar-Ratten verwandt. Je 1 mg des leicht wasserlöslichen Dexamethason-Hemisuccinates (Solufortecortin Merck), das in Pulverform vorliegt, wurde in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und den Tieren langsam in die Schwanzvene injiziert. Mit Hilfe einer Tuberkulin-Spritze ist die Injektion mit einer 16-Kanüle leicht ausführbar. Bei einmaliger Dexamethason-Blockade wurde nach Ablauf von 6 Stunden die Nebennieren-Venenkanulierung vorgenommen. Bei der viermaligen Hemmung wurden die Tiere der zweiten Serie über einen Zeitraum von 3 Tagen oder 72 Stunden mit Dexamethason behandelt. Sie erhielten 4 Einzeldosen von je 0,5 mg in regelmäßigen Zeitabständen gleichfalls via Schwanzvene appliziert. Die Nebennieren-Venenkanulierung erfolgte jeweils 6 - 8 Stunden nach der letzten Dexamethason-Injektion.

2) Hypophysektomie nach Collip, Selye und Thomsen

Nach Basisnarkose mit Nembutal (2 mg/100 g Körpergewicht auf 1 ml physiologische Kochsalzlösung i. v. via Schwanzvene) und leichter Äthernarkose, wurde die Ratte in Rückenlage aufgespannt, wobei mit Hilfe einer in die Nagezähne des Oberkiefers eingehakten Kette der Kopf nach außen gezogen und fest fixiert wurde. Die Haut wurde nach dem Auszupfen der Haare vom Unterkieferwinkel bis zum Jugulum gespalten, die Speicheldrüsen stumpf präpariert und auseinandergezogen, so daß der M. digastricus und der M. hypoglossus vom Kehlkopf freipräpariert werden können. Zur Luft- und Ätherzufuhr wurde zwischen dem zweiten und

dritten Trachealknorpel unterhalb des Larynx eine kleine Inzision gesetzt und der austretende Schleim mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Mit gewinkelten Pinzetten wurde die pterygoide Muskelgruppe von der suprahyoidealen getrennt und der Pharynx stumpf von der Schädelbasis abpräpariert, bis die Sphenooccipitalis gut sichtbar im Operationsfeld erschien. Da der Operationskanal verhältnismäßig tief liegt, ist die Benutzung einer Stirnlampe zu empfehlen. Die Schädelbasis wurde mit einem Zahnbohrer trepaniert und die freiliegende Hypophyse mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Trepanationsöffnung mit resorbierbarer Fibrinwatte austamponiert. Um eine Infektion zu vermeiden, wurde die Operationswunde mit Supronallösung abgetupft. Auf ein Vernähen der Trachea kan verzichtet werden, da die Inzisionsstelle auch ohne Naht erfahrungsgemäß rasch verheilt. Die Operationswunde wurde mit Catgut verschlossen und mit Penicillinpulver nachbehandelt.

3) Nebennieren-Venen-Kanulierung

Zur Operation werden vorbereitet: Ein Katheter Clay-Adams PE 50 zur Kanulierung der linken V. jugularis von etwa 20 cm Länge. Ein Katheter Clay-Adams PE 50, Länge etwa 20 cm zur Kanulierung der linken V. femoralis. Dieser Katheter wird an einem Ende durch leichtes Erwärmen über einer Gasflamme unter gleichzeitigem Zug etwas verdünnt. Mit diesem Ende, das in die V. femoralis eingeführt wird, kommt der Katheter in die linke Nebennieren-Vene zu liegen. Die beiden Katheter werden über passende Injektions-Kanülen auf 5-ml-Glasspritzen montiert, die 3 ml physiologische Kochsalzlösung mit Heparinzusatz enthalten (100 E pro ml Li-quemin Roche).

Die Narkose, der mit Dexamethason vorbereiteten Tiere wird mit Nembutal (4 mg/100 g Körpergewicht) via Schwanzvene entsprechend der für Dexamethason geschilderten Injektionstechnik vorgenommen. Die Ratten werden dann mit der Bauchseite nach oben auf einem geeigneten Operationstischchen befestigt, indem die vier Extremitäten in Gummischlingen oder entsprechenden Klammern gespannt werden. Der Katheter für die linke V. jugularis wird mit einer Pinzette nach dem Herzen zeigend in die Vene eingeführt und fixiert. Das Gefäß ist leicht auffindbar, wenn man es nach einem paramedianen Halslängsschnitt am medialen Sternocleido-Rand zwischen den tiefen Halsmuskeln freipräpariert. Durch diesen Katheter wird nach der ersten 10-Minuten-Sammelperiode die zu testende ACTH-Charge injiziert.

Die Katheterisierung der linken Nebennieren-Vene wird von der linken V. femoralis aus durchgeführt. Zur Präparation dieser Vene in der linken Schenkelbeuge des auf dem Rücken liegenden Tieres, werden nach dem Hautlängsschnitt Fett und Faszien des Gefäßbündels in dessen Längsrichtung mit zwei feinen Pinzetten weggezogen. Um die Vene, die über eine Länge von mindestens 5 mm völlig frei und sauber dargestellt sein muß, werden vorsichtig zwei Fadenschlingen gelegt und die distale Schlinge zugezogen. Das Gefäß kontrahiert sich bei grober Behandlung sofort vollständig und die Kanulierung wird dadurch unmöglich. Bei weitem Lumen läßt sich das Gefäß mit einer feinen Schere halb eröffnen, wonach eine Hilfsperson das dünne Ende des Katheters einige cm weit einschleibt. Sofort injiziert man langsam einige ml liqueminisierte Kochsalzlösung, um eine Verstopfung des Katheters zu vermeiden. Die Ligatur wird nur so weit zugezogen, daß der eingeführte Katheter gerade noch gleitet.

Laparatomie: Entlang der Linea Alba wird nun der Bauch der Ratte auf einige cm eröffnet und das Eingeweidepaket mit der Milz nach rechts weggezogen, so daß die großen Bauchgefäße mit der Einmündung der V. renalis sinistra sichtbar werden. Meist ist der durch die V. femoralis eingeführte Katheter durch die Wand der V. cava caudalis sichtbar, besonders bei leichtem Hin- und Herbewegen. Er läßt sich nun mit Hilfe einer dünnen, stumpfen Pinzette unter gleichzeitigem Vorschieben in die V. renalis und von hier in die V. suprarenalis, deren Einmündung deutlich sichtbar ist, hineindirigieren. Der Katheter wird jetzt mit der Lizatur in der V. femoralis fest eingebunden und die Bauchdecken der Ratte nach Reposition der Eingeweide mit einigen Federklammern verschlossen. Sobald sich der Katheter in der Nebennieren-Vene befindet, wird mit dem Sammeln des ausfließenden Blutes in 10-Minuten-Abständen in Wassermannröhrchen begonnen. Bei einiger Übung läßt sich die Operation von zwei Personen, die sich günstigerweise gegenüber sitzen, in 15 bis 20 Minuten bewerkstelligen.

Blutentnahme und ACTH-Gabe: Während genau 10 Minuten wird eine erste Blutportion gesammelt. Die Menge des in dieser Zeit aus der Nebenniere ausfließenden Blutes ist unterschiedlich, kann jedoch bis zu 2 ml betragen. In den folgenden 5 Minuten wird die ACTH-Lösung durch den Jugularis-Katheter injiziert. Währenddessen beginnt die zweite 10-Minuten-Abnahme. Durch Injektion einer größeren Menge von Nembutal durch den Jugularis-Katheter nach der letzten Blutentnahme werden die Tiere rasch und schmerzlos getötet. Bei sorgfältig und schnell ausgeführter Operation wird der Eingriff in der Regel sehr gut toleriert und die Tiere würden erst nach Stunden an den diffusen Blutungen aufgrund der Heparinisierung zugrunde gehen.

4) Corticosteron-Messung nach Zenker und Bernstein

Die von Zenker und Bernstein (1958) ausgearbeitete Methode zur Bestimmung von Corticosteron in Körperflüssigkeiten beruht auf einer Fluoreszenzmessung des an Schwefelsäure gekoppelten Corticosterons im Photometer. Die Methode stellt eine Kombination der Extraktionstechnik nach Silber und Porter (1954) mit der modifizierten Fluoreszenztechnik nach Sweat (1953) dar (Vaubel (1961)).

Prinzip des Arbeitsganges: Das Plasma, das durch scharfes Zentrifugieren des Nebennieren-Venenblutes gewonnen wird, versetzt man mit Chloroform als Lösungsmittel und extrahiert damit das Corticosteron. Aus dieser Lösung werden Fremdsbstanzen mit 0,1 n NaOH ausgewaschen. Die wässrige Phase wird jeweils durch Zentrifugieren abgetrennt und durch Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe entfernt. Als Fluoreszenz-Reagens dient ein Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure und Aethylalkohol, welches mit dem Chloroformextrakt versetzt wird, wobei es mit dem gelösten Corticosteron eine Komplement-Bindung eingeht, welche fluoresziert. Diese Fluoreszenz kann nach den Untersuchungen von Lohmann (1960) bei einer geeigneten Filterkombination im Photometer Eppendorf mit Fluorometer-Zusatz in Extinktions-Einheiten gemessen werden. Der Bereich, in dem zwischen der Konzentration und der Fluoreszenz des Corticosterons eine lineare Beziehung herrscht, liegt nach Zenker und Bernstein bei 0,05 bis 5,0 gamma Corticosteron. Die Corticosteron-Mengen des Nebennierenvenen-Blutes liegen bei 10-minütiger Abnahmedauer innerhalb des optimalen Bereiches dieser Methode.

5) Berechnung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Meßergebnisse für die Corticosteron-Anstiege nach verschiedenen ACTH-Chargen erfolgte nach den unter Tabelle 1 angegebenen Formeln, wobei bedeuten:

F = prozentualer Fehler, b = Steigung der Geraden,
S_b = Standardabweichung, λ = Genauigkeitsindex.

III. ERGEBNISSE

1) Corticosterongehalt im Nebennieren-Venenblut nach einmaliger Hypophysenblockade mit Dexamethason

Innerhalb dieser Versuchstiergruppe waren die Absolutmengen des Corticosteron in beiden 10-Minuten-Abnahmen von Tier zu Tier sehr unterschiedlich hoch. Die Corticosteronwerte der ersten Abnahme (Basiswert) schwankten zwischen den niedrigen Werten (0,59 gamma Corticosteron pro 10 Minuten), die nach operativer Hypophysektomie gefunden wurden und den hohen Werten der nicht gehemmten Kontrollen (3,1 gamma Corticosteron pro 10 Minuten). Bei der Mehrzahl der Tiere lagen die Corticosteronwerte ein geringes unter dem Durchschnitt der unbehandelten Kontrollen (3,5 gamma Corticosteron pro 10 Minuten).

Die Corticosteron-Mengen der zweiten Abnahme (Anstiegswert) waren, obwohl kein ACTH gegeben wurde, in fast allen Fällen vom Basiswert verschieden. Je nach dessen Lage, bezogen auf die Maximalausschüttung, waren sie entweder höher oder tiefer. Aufgrund dieser unspezifischen Schwankungen des Anstiegswertes bei einmaliger Dexamethasongabe wurde auf ACTH-Belastung innerhalb dieser Versuchstiergruppe verzichtet (Abb. 2; 1. und 2. Spalte).

2) ACTH-Effekt auf den Corticosterongehalt des Nebennieren-Venenblutes nach 4-maliger Dexamethasonblockade

Nach 4-maliger Hemmung mit Dexamethason über einen Zeitraum von 3 Tagen war der Corticosteron-Gehalt des Nebennieren-Venenblutes bei allen Tieren dieser Gruppe deutlich gegenüber den unbehandelten Kontrollen erniedrigt und lag im Mittel bei 0,27 gamma Corticosteron pro 10 Minuten. In der entsprechenden Kontrollgruppe ohne ACTH-Gabe zeigte der Anstiegswert nur minimale, unspezifische

Schwankungen gegenüber dem Leerwert, und zwar kam es in allen Fällen zu einer geringen Mehrausschüttung von Corticosteron, die im Mittel 0,13 gamma pro 10 Minuten betrug (Abb. 2, 3. Spalte). Die Gabe von 0,1 und 1,0 mE ACTH war in allen Fällen von einem signifikanten Corticosteron-Anstieg gefolgt. Die Eichkurve wurde aufgrund früherer Arbeiten dieses Labors (Vaubel (1961)) und derselben Beziehungen bei der hypophysektomierten Ratte in semilogarithmischem Maßstab als Gerade dargestellt (Abb. 3). Die Empfindlichkeitsschwelle liegt wegen der unspezifischen Schwankungen bei 0,1 mE ACTH, die Steigung der Geraden beträgt 0,19, der Genauigkeitsindex $\lambda = 1,37$.

3) ACTH-Effekt auf den Corticosteron-Gehalt des NNV-Blutes nach operativer Hypophysektomie

In der dritten Versuchsserie wurde der Vergleich der Hypophysenhemmung durch Dexamethason mit der operativen Hypophysektomie durchgeführt. Der totalen Ausschaltung der endogenen ACTH-Produktion entsprechend zeigte diese Tiergruppe 6 bis 12 Stunden nach der Hypophysektomie extrem niedrige Corticosteron-Mengen im Nebennieren-Venenblut, die im Mittel 0,08 gamma pro 10 Minuten betrugen. Unspezifische Anstiege des Corticosterons fehlten vollkommen, da die Werte aus erster und zweiter Abnahme praktisch identisch und auch innerhalb der ganzen Versuchsserie annähernd gleich waren, solange kein ACTH gegeben wurde (Abb. 2; 4. Spalte). Die Belastung mit 0,05; 0,1; 0,5 und 1,0 mE ACTH ergab eine lineare Beziehung zwischen dem log ACTH-Dosis und dem Anstieg des Corticosterons. Die Steigung der Geraden $b = 0,34$ war höher als in der Dexamethason-Serie, der Genauigkeits-Index dementsprechend $\lambda = 0,13$ (Abb. 4).

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die quantitative Bestimmung von ACTH ist aufgrund des im halblogarithmischen Maßstab linearen Anstiegs der Corticosteron-Sekretion der Nebennierenrinde als Folge einer ACTH-Zufuhr mit großer Genauigkeit möglich. Voraussetzung für die Untersuchung ist die Ausschaltung der ratteneigenen ACTH-Produktion. Die Messung des Corticosteron-Basis- und Anstiegswertes kann dann sowohl im peripheren Blut der Ratte als auch im Nebennieren-Venenblut erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die von Ifeiffer und Mitarbeitern (1960) angegebene funktionelle Blockade der Rattenhypophyse mit Dexamethason auch bei der ACTH-Bestimmung anhand des Corticosteron-Anstiegs im Nebennieren-Venenblut zu verwenden.

Bei der hier gewählten Versuchsanordnung wurden zunächst drei Tierserien angesetzt. Die erste Serie erhielt einmalig 1 mg Dexamethason, die zweite Serie 3 Tage lang mehrmals je 0,5 mg Dexamethason, während die Tiere der dritten Serie zum Vergleich hypophysektomiert wurden. Bei der Mehrzahl der Versuchstiere der ersten Serie zeigte es sich, daß die einmalige Zufuhr von 1 mg Dexamethason nicht ausreichte, um die Hypophysenfunktion während und nach der zur Nebennierenvenen-Kanulierung notwendigen Laparatomie genügend zu hemmen, da keine wesentliche Erniedrigung des Corticosterons im Nebennieren-Venenblut gefunden wurde. Hierbei war jedoch eindeutig ein Zusammenhang zwischen der Schwere beziehungsweise der Zeitdauer des Operationstraumas und der Höhe der Corticosteron-Ausschüttung zu erkennen. Denn bei schnellem, reibungslosem Operationsverlauf ergaben sich auffallend niedrige Corticosteron-Werte für die erste 10-Minuten-Abnahme zur Ermittlung des Basiswertes und ohne exogene ACTH-Zufuhr weitaus höhere bei der zweiten 10-Minuten-

Abnahme zur Ermittlung des Anstiegswertes. Dies ist nur durch die Ausschüttung von ratteneigenem ACTH zu erklären, weil diese Reaktion bei der hypophysektomierten Ratte ausbleibt. Dementsprechend ergaben sich hohe Corticosteronwerte bei verzögertem Operationsverlauf, während die Werte der zweiten Abnahme wegen der Erschöpfung der Nebennierenrinde meistens erniedrigt waren. Die Ausschüttung des endogenen ACTH war in diesem Falle trotz des momentan hohen Dexamethasonspiegels in der Zirkulation von neurohumoralen oder anderen Mechanismen verursacht worden.

Erst die mehrmalige Injektion von je 0,5 mg Dexamethason an drei Tagen hatte eine ausreichende Verminderung der Corticosteron-Sekretion während der Gesamtdauer der Operation zur Folge. Die während der Blockierung ermittelten Werte um 0,27 gamma Corticosteron pro 10 Minuten sprechen für eine wirksame Hemmung der Hypophyse. Die langdauernde Steroidzufuhr war also in der Lage, die durch die Laparatomie bedingte endogene ACTH-Freisetzung weitgehend zu unterdrücken. Nach Pfeiffer und Mitarbeitern (1960) und Hamburger (1960) betrifft die Hemmwirkung des Dexamethasons nicht allein die Hypophyse. Es besteht auch ein Hemmeffekt auf die Steroidsynthese und die Basalsekretion der Nebennierenrinde. Dadurch lassen sich die niedrigen Corticosteronwerte im Nebennieren-Venenblut erklären. Die Zufuhr verschiedener Mengen von ACTH bewirkte in jedem Falle einen deutlichen Anstieg der Corticosteron-Ausschüttung, wobei ein Schwellenwert von 0,1 mE ACTH festgestellt wurde. Da die Schwellendosis bei der Corticosteron-Messung im peripheren Blut der Ratte ebenfalls 0,1 mE ACTH beträgt, ergibt sich keine Verbesserung gegenüber der einfacheren Meßmethode in der Peripherie. Der Genauigkeitsindex $\lambda = 1,19$ ist aufgrund der unspezifischen Schwankungen von Basis- und Anstiegswert des Corticosterons im Nebennieren-Venenblut relativ hoch. Diese Schwankungen müssen ebenfalls auf die Freisetzung

von endogenem ACTH zurückgeführt werden, denn beim hypophysektomierten Tier fehlen sie vollkommen. Bei den hypophysektomierten Ratten der dritten Serie liegt die Empfindlichkeitsgrenze für exogenes ACTH entsprechend tiefer bei 0,05 mE, da der jeweilige Corticosteron-Anstieg auf gleiche ACTH-Mengen höher als nach Dexamethason-Blokade ist. Der angestrebte Vorteil der Nebennieren-Venen-Kanulierung, kleinste Corticosteronschwankungen bei relativ großen Hormonmengen zu erfassen, kommt daher nur bei der hypophysektomierten Ratte in einer wesentlichen Steigerung der Genauigkeit bei der Bestimmung einzelner ACTH-Dosen zur Geltung. Bei der Fluoreszenzmessung des Corticosterons nach Zenker und Bernstein kann in diesen Mengenbereichen auf Doppelbestimmungen verzichtet werden. Die Genauigkeit ist dabei für einen in-vivo-Test an einem einzelnen Tier außerordentlich hoch, in der ACTH-Eichkurve ist $\lambda = 0,13$. Lipscomb und Nelson (1959) sowie Liddle et al. (1960) gaben ebenfalls bei der Messung des Corticosteron-Anstiegs im Nebennieren-Venenblut der hypophysektomierten Ratte die Schwellendosis mit 0,05 mE ACTH an, wobei die Extraktion und Messung des Corticosterons zum Unterschied von der vorliegenden Arbeit nach der Methode von Silber, Bush und Oslapas (1958) vorgenommen wurde.

In Übereinstimmung mit der peripheren Methode weisen die in Abbildung 3 und 4 dargestellten Eichkurven eine lineare Regression der Corticosteron-Anstiege in Abhängigkeit von der ACTH-Dosis auf. Die nachweisbare Schwellendosis von exogenem ACTH liegt bei 0,05 mE ACTH. Deshalb ist auch bei Verwendung der von Pfeiffer und Mitarbeitern (1960) angegebenen Methode die Bestimmung von ACTH im Nativblut des gesunden Menschen nur bedingt möglich. Eine weitere Erniedrigung der Nachweisbarkeitsgrenze für ACTH ist durch methodische Veränderungen der ACTH-Bestimmung an der 200-g Ratte kaum möglich, da hiermit die unterste Grenze der biologischen Nachweisbarkeit für ACTH erreicht zu sein scheint.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung von ACTH ist in einfacher Weise mit dem von Pfeiffer und Mitarbeitern (1960) entwickelten ACTH-Test an der Ratte durchführbar. Nach medikamentöser Blockade der Rattenhypophyse mit Dexamethason wird bei Zufuhr von exogenem ACTH der Anstieg des Corticosterons im peripheren Blut gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit diesem Test eine Steigerung der Empfindlichkeit zur Messung von ACTH im Nativblut des gesunden Menschen zu erreichen, indem der Corticosteron-Anstieg anstatt in der Peripherie im Nebennieren-Venenblut der Dexamethason-blockierten Ratte gemessen wurde.

Bei der experimentellen Durchführung wurde in drei Versuchsserien die ACTH-abhängige Corticosteron-Ausschüttung in das Nebennieren-Venenblut von Ratten gemessen. Die Hypophysenfunktion dieser Tiere war vergleichsweise durch Hypophysektomie und durch kurz- und langzeitige funktionelle Hypophysenhemmung mit Dexamethason ausgeschaltet worden. Dabei ergab sich:

Eine einmalige hohe Gabe von Dexamethason ist bei der mit einer Laparatomie verbundenen Nebennieren-Venen-Kanulierung als Hypophysenblockade unzureichend, da endogenes ACTH freigesetzt wird. Dies erlaubt keine Bestimmung von exogenem ACTH. Erst die dreitägige Zufuhr von Dexamethason führte zu einem ausreichenden Hemmeffekt auf die Hypophyse. Dabei ergaben sich für die Corticosteron-Ausschüttung in Abhängigkeit von exogen zugeführtem ACTH im Bereich von 0,1 bis 1,0 mE ACTH in halblogarithmischer Darstellung lineare Eich-Kurven. Aus diesen Kurven ist zu entnehmen, daß die untere Nachweisbarkeitsgrenze an der bis 200 g schweren Ratte bei 0,1 mE ACTH liegt. Die Steigung der Kurve beträgt $b = 0,19$, bei einem Genauigkeitsindex $\lambda = 1,37$

Es besteht daher gegenüber der technisch einfacheren ACTH-Bestimmung anhand des Corticosteron-Anstiegs im peripheren Blut der Ratte kein Vorteil, vor allem da zum Nachweis von ACTH im Nativblut des gesunden Menschen eine Nachweisbarkeitsgrenze von 0,025 mE ACTH pro ml Testlösung erreicht werden müßte.

Bei Verwendung von hypophysektomierten Ratten wurde dagegen eine sehr hohe Genauigkeit für einen in-vivo-Test am einzelnen Tier gefunden. Er gestattet die Bestimmung von 0,05 mE ACTH im Bereich von 0,05 bis 1,0 mE ACTH bei einer Genauigkeit von $l = 0,13$ und einer Steigung der Geraden $b = 0,34$. Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit des biologischen Nachweises von ACTH an der bis 200 g schweren Ratte erscheint daher aufgrund methodischer Variationen allein unwahrscheinlich.

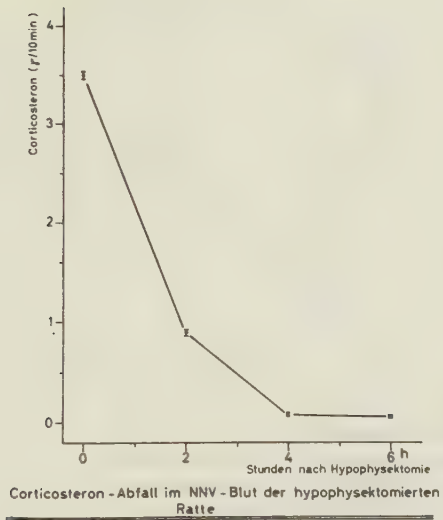


Abbildung 1

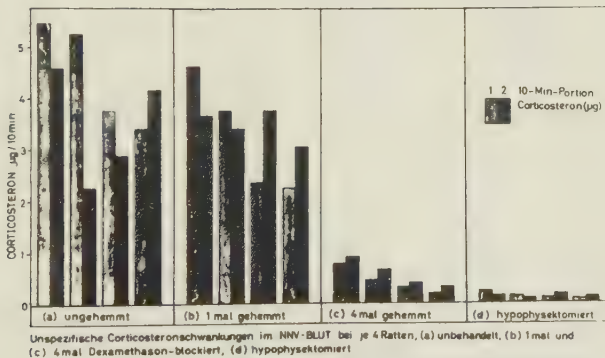
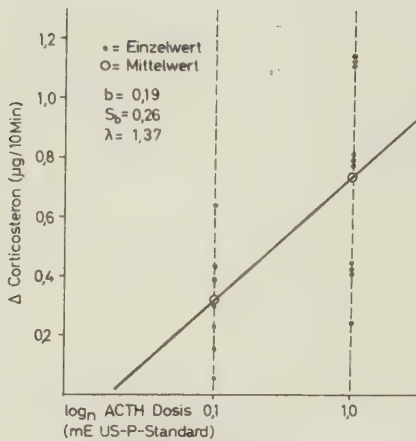
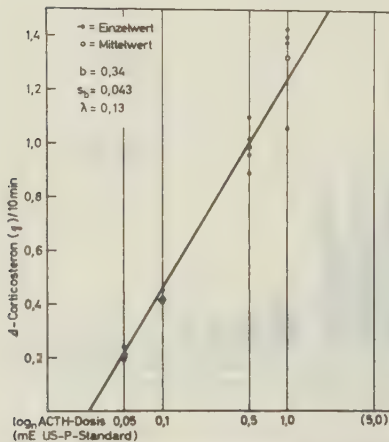


Abbildung 2



Anstieg von Corticosteron/10Min im NN-Venenblut Dexamethason blockierter (4x) Ratten nach Injektion von 0,1 und 1,0 mE ACTH (US-P-Standard)

Abbildung 3



Lineare Regression zwischen $\log_{10}$ ACTH-Dosis und Anstieg des Plasma-Corticosterons/10 min im Nebennierenvenenblut hypophys-ektomierter Ratten im Bereich von 0,05 - 1,0 mE ACTH(US-P-Stand.)

Abbildung 4

Tabelle 1

mE ACTH (d)	Δ CORTICOSTERON (µg/10 Min) (y)	
	Dexamethason- blockade	Hypophysektomie
0,05		0,22 0,20 0,21 0,22
0,1	0,34 0,31 0,30 0,05 0,15 0,64 0,43 0,39 0,23	0,42 0,41 0,45 0,43
0,5		1,10 0,89 1,02 0,96
1,0	0,41 0,78 0,79 0,81 0,45 0,24 1,11 1,13 1,15	1,06 1,40 1,43 1,39
Statistische Auswertung:	P = 0,01 b = 0,19 S _b = 0,26 λ = 1,37	b = 0,34 S = 0,043 λ = 0,13
$b = \frac{\sum(xy) - \bar{y} \cdot \sum(x)}{\sum(x^2) - \bar{x} \cdot \sum(x)} ; \quad (S_b)^2 = \frac{1}{n-2} (\sum y - \bar{y} \cdot \sum y - b(\sum xy - \bar{x} \cdot \sum y)) ;$		
$\lambda = \frac{S_b}{b} ; \quad x = \log_n d$		

Corticosteron-anstieg (µg/10 Min) im Nebennierenvenen-
blut von Dexamethason-blockierten und hypophysektomierten
Ratten nach Injektion unterschiedlicher ACTH-Dosen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abderhalden, R.: Die Hormone. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1952).
- Addison, T.: On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules, London 1855.
- Ammon, R. und W. Dirscherl: Fermente, Hormone und Vitamine, Bd. II Hormone, Georg Thieme, Stuttgart 1960.
- Anselmino, K.J. und F. Hoffmann: Über das corticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens, Klin. Wschr. 13 (1934) 209.
- Astwood, E.B. und R. Tyslowitz: An assay method for corticotropin, Fed. Proc. 1 (1942) 4.
- Astwood, E.B. and A.B. Grady: Purification of corticotropin with oxycellulose, J. Amer. chem. Soc. 73 (1951) 2969.
- Bazemoore, G.W., J.W. Richter, D.E. Ayer, J. Finnerty, N.G. Brink and K. Folkers: Pituitary Hormones. IV. The Preparation of potent concentrates of corticotropin-A and corticotropin-B, J. Amer. chem. Soc. 75 (1953) 1949.
- Bell, Ph.: Structure of B-Corticotropin. Final sequence studies, J. Amer. chem. Soc. 77 (1955) 3419.
- Bernard, C.: Leçons de physiologie expérimentale au Collège de France, Paris 1855.
- Bernstein, D.E.: Transplantation of adrenal gland in spleen of rats, Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. (N.Y.) 75 (1950) 847.
- Berthold, B.: Über den Aufenthalt lebender Amphibien im Menschen. Arch. Anat. Physiol. 42 (1849) 430.
- Biedl, A.: Lehrbuch der Inneren Sekretion 2. Aufl. 1913. Urban & Schwarzenberg, Berlin-Wien.
- Boissonnas, R.A., S. Guttman, J.P. Waller and P.A. Jaquenoud: Synthesis of a Polypeptide with ACTH-like structure. Experientia 12 (1956) 446.
- Brown-Séquard, C.E.: Recherches expérimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrénales, Compt. rend. Acad. sc. Paris 43 (1856) 422.

- Brown-Séquard, C.E.: Du rôle physiologique et thérapeutique d'un suc extrait de testicules d'animaux d'après nombre de faits observés chez l'homme, Arch. de Physiol. 1 (1889) 739.
- Bruce, H.M., A.S. Parkes and W.L.M. Ferry: Assay of ACTH on the thymus of the young rat, Lancet 262 (1952) 760.
- Bush, J.E.: Species differences and other factors influencing adrenocortical secretion, Ciba Found. Coll. End. 7 (1953) 210.
- " Recent work on the Secretion of the Adrenal Cortex, Schweiz. med. Wschr. 85 (1955) 645.
- Cole, R.D., C.H. Li: Corticotropins (ACTH) VIII. The action of pepsin on A-Corticotropin and the C-terminal amino-acid sequence, J. Biol. Chem. 219 (1956) 903.
- Colfer, H.F., J. de Groot and G.W. Harris: Pituitary gland and blood lymphocytes, J. Physiol. 111 (1950) 328.
- Collip, J.B., H. Selye and L.L. Thompson: Hypophysektomie der Ratte, Virchow Arch. 290 (1953) 24.
- Collip, J.B., F.M. Anderson, D.L. Thompson: Adrenotropic hormone of anterior pituitary lobe, Lancet 1933 II 347.
- De Groot, J. und G.W. Harris: Hypothalamic control of anterior pituitary gland and blood lymphocytes, J. Physiol. London 111 (1950) 335.
- Dixon, J.S., T.B. Lo und C.H. Li: Adrenocorticotropin (ACTH) XXII. The counter-current distribution behaviour in a single solvent system of adrenocorticotropins from sheep, beef and pig pituitary glands, Arch. Biochem. Biophys. 92 (1961) 296.
- Engel, F.L., G. Engel: The action of corticotropin on carbohydrate metabolism. Endocrinology 58 (1956) 808
- Fujita, T.: Determination of Corticotropin (ACTH) in human blood and urine by a modified oxycellulose method, J. Clin. Endocrin. 17 (1957) 512.

- Guillemin, R., W.E. Dear, B. Nichols: ACTH-releasing activity in vivo of a CRF preparation and lysine vasopressin, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 101 (1959) 107.
- Guillemin, R.: Hypothalamic control of the anterior hypophysis and its metabolic implications, *Diabetes* 8 (1959) 352.
- Hamburger, C.: Assay of Corticotropin; Prednisolon pretreatment instead of hypophysectomy in the adrenal ascorbic acid depletion test, *Acta Endocrinologica* 35 (1960) 594.
- Harris, G.W.: Neural control of the pituitary gland. II. The adeno-hypophysis with special reference to the secretion of ACTH, *Brit.M.J.* 4732 (1951) 627.
- Hayashida, T., C.H. Li: Enhancement of adrenocorticotrophic hormone activity by alum in normal 21-day old male rats, *Endocrinology* 50 (1952) 187.
- Hechter, O. und G. Pincus: Genesis of the adrenocortical secretion, *Physiol. Rev.* 34 (1954) 459.
- Hedner, F. und C. Reirup: Adrenocortical activity following corticotropin injection at low adrenal ascorbic-acid level, *Acta Endocrinologica* 41 (1962) 219.
- Henle, G.F.J.: Über das Gewebe der Nebenniere und der Hypophyse, *Zschr. rat. Med.* 3. Reihe 24 (1865) 143.
- Hodges, J.R.: A modified adrenal ascorbic acid depletion technique for the bioassay of ACTH, *J. Endocr.* 12 (1955) 152.
- Hoff, F.: Steuerungseinrichtungen des Organismus in Gesundheit und Krankheit, Leipzig, Thieme 1943.
- Hofmann, K. und A. Jöhl: Studies on Polypeptides. VI. Synthetic confirmation of N-terminal amino-acid sequence of corticotropin-A, *J. Amer. chem. Soc.* 77 (1955) 2914.
- Hofmann, K., H. Yagima, E.T.Schwartz: Studies on polypeptides. XIII. The synthesis of a derivate of a MSH possessing a high degree of melanocyte-expanding activity in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* 36 (1959) 252.

- Howell, W.H.: The physiological effects of extracts of the hypophysis cerebri and infundibular body, *J. exp. Med.* 3 (1898) 245.
- Koller, M.: Auswertung der corticotropen Wirkung des ACTH auf die durch Cortison bedingte Nebennierenrinden-Atrophie, *Arzneimittel-Forsch.* 10 (1960) 3:205.
- Labhart, A.: *Klinik der inneren Sekretion*, Springer 1957.
- Li, C.H., L.L. Geschwind, R.D. Cole, I. Raacke: Amino acid sequence of alpha-corticotropin, *Nature, London*, 176 (1955) 687.
- Li, C.H., J.S. Dixon and D. Chung: The Amino acid sequence of bovine adrenocorticotropin, *Biochem. Biophys. Acta* 46 (1961) 324.
- Li, C.H., J. Meierhofer, E. Schnabel: The synthesis of a nona-decapeptide possessing adrenocorticotropic and melanotropic activities, *J. Amer. chem. Soc.* 82 (1960) 5760.
- Lipscomb, H.S. and D.H. Nelson: Measurement of corticosterone in rat adrenal venous plasma as bioassay for ACTH, *Fed. Proc.* 18 (1959) 95.
- Lipscomb, H.S. Persönliche Mitteilungen (1961).
- Lohmann, Ch.: *Inaugural-Dissertation Universität Frankfurt/Main* (1960).
- Long, C.N.H.: Regulation of ACTH-Secretion, *Endocrinology* 32 (1943) 373.
- Moruzzi, G., C.A. Rossi, L. Montanari, M. Martinelli: Blood-ACTH in man: "Active" and "Activable" Fraction, *J. Clin. Endocrinol.* 14 (1954) 1144.
- Munson, P.L. and F.N. Briggs: The mechanisms of stimulation of ACTH-secretion, *Rec. Progr. Hormone Res.* 11 (1955) 83.
- Munson, P.L. and W. Toepel: Detection of minute amounts of adrenocorticotropic hormone by the effect on adrenal venous ascorbic acid, *Endocrinology* 62 (1958) 785.

- Nelson, D.H., L.T. Samuels, T. Willardson, F.H. Fyler: The levels of 17-hydroxycorticosteroids in the peripheral blood of human subjects, *J. clin. Endocrinol.* 11 (1951) 1021.
- Nelson, D. H. and D.M. Hume: Corticosteroid secretion in the adrenal venous blood of the hypophysectomized dog as an assay for ACTH, *Endocrinology* 57 (1955) 184.
- Ogryzlo, F. and L. Gornall: Variation in potency of ACTH-preparations, inadequacy of present methods of standardization, *J. clin. Endocrinol. & Metabol.* 13 (1953) 165.
- Oliver, G. and E.A. Schäfer: On the physiological action of extracts of pituitary body and certain other glandular organs, *J. Physiol.* 18 (1895) 277.
- Paris, J., M. Upson, R.G. Sprague, R.M. Salassa and A. Albert: Corticotropic activity of human blood, *J. clin. Endocrinol.* 19 (1959) 334.
- Pfeiffer, E.F., E. Vaubel, K. Retiene, D. Berg und H. Ditschuneit: ACTH-Bestimmung mittels Messung des Plasma-Corticosterons der mit Dexamethason hypophysen-blockierten Ratte, *Klin. Wschr.* 38 (1960) 523. 980
- Rerup, C. and I. Hedner: On the assay of corticotropin; comparison of the plasma-corticosteroid and adrenal ascorbic acid response, *Acta Endocrinol.* 38 (1961) 220.
- Retiene, K., H. Ditschuneit, M. Fischer, K. Kopp und E.F. Pfeiffer: Corticotropin-Bestimmung anhand des Corticosteron-Anstieges im Nebennieren-Venenblut hypophysen-blockierter Ratten. Vergleich von Dexamethason-Blockade und Hypophysektomie. *Acta Endocrinol.* 41 (1962) 211.
- Safran, M. and A.V. Schally: In vitro bioassay of corticotropine. Modification and statistical treatment, *Endocrinology* 56 (1955) 523.
- Sayers, M.A., G. Sayers a. C.A. Woodburry: The assay of adrenocorticotrophic hormone by the adrenal ascorbic acid depletion method, *Endocrinology* 42 (1948) 379.
- Sayers, G.: The adrenal cortex and homeostasis, *Physiol. Rev.* 30 (1950) 241.

- Schmid, R., L. Gonzalo und R. Blobel, E. Muschke und E. Tonutti:
Zur hypothalamischen Steuerung der ACTH-Abgabe
aus der Hypophyse, *Naturwissenschaften* 43
(1956) 424.
- Schwyzler, R., W. Rittel, H. Kappeler und B. Iselin: Synthese
eines Nonadeca-Peptides mit hoher corticotroper
Wirksamkeit, *Angew. Chemie* 72 (1960) 915.
- Selye, H. The story of the adaptation syndrome, Stuttgart,
Thieme 1953.
- Silber, R.H., R.D. Bush and R. Oslapas: Practical procedure
for estimation of corticosterone and of hydro-
cortisone, *Clin. Chem.* 4 (1958) 278.
- Simpson, M.E., H.M. Evans and C.H. Li: Bioassay of adrenocorti-
cotropic hormone, *Endocrinology* 33 (1943) 261.
- Smith, F.E.: Hypophysektomie and replacement therapy in rat,
Amer. J. Anat. 45 (1930) 205.
- Starling, E.H. Croonian Lectures Royal College of Physicians,
London 1905, *Lancet*, Aug. 1905.
- Sulmann, F.G.: Chromatophorotropic effect of adrenocortico-
tropic hormone, *Nature*, London 169 (1952) 588.
- Sweat, M.L.: Sulfuric acid-induced fluorescence of corticosteroids
Analyt. Chem. 26 (1954) 773.
- Sydnor, K.L., G. Sayers, H. Brown and F.H. Tyler: Preliminary
studies on blood-ACTH in man, *J. clin. Endo-
crinology* 13 (1953) 891.
- Sydnor, K.L.: Blood ACTH in the stressed adrenalectomised rat
after intravenous injection of hydrocortisone,
Endocrinology 56 (1955) 204.
- Soemmering v., S.T.: De basi encephali et originibus nervorum
cranio egredientium, Dissertation Göttingen
1779.
- Teppermann, J., F.L. Engel and C.H. Long: A review of adrenal
cortical hypertrophy, *Endocrinology* 32 (1943)
373.
- Thorn, G.W., P.H. Forsham, I.G. Prunty and A.G. Hills: Test for
adrenal cortical insufficiency; response to
pituitary adrenocorticotrophic hormone, *Amer.
Med. Ass.* 137 (1948) 1005.

- Vaubel, E.W.: Inaugural-Dissertation Universität Frankfurt
am Main 1961
- Verfasser: Synthetic ACTH, Brit. Med. J. 5216 (1960) 1866.
- Verne, J., R. du Boistesselin, A. Demay: Application du
blocage pharmacodynamique de la secretion
de corticotropine hypophysaire dans la réa-
lisation des tests histologiques de dosage
de l'ACTH, Ann. Endocrinol. 20 (1959) 823.
- White, W.F.: Studies on adrenocorticotropin. V. The isolation
of corticotropin-A, J. Amer. chem. Soc. 75,
(1953) 503.
- White, W.F. and W.A. Landmann: A preliminary comparison of
corticotropin-A with B-corticotropin, J.
Amer. chem. Soc. 76 (1954) 4193.
- Zenker, W.F. and R.L. Peters: Studies on adrenocorticotropin.
VII. The isolation of two highly active
bovine Types, J. Amer. chem. Soc. 78 (1956)
4181.
- Zenker, N. and D.E. Bernstein: The estimation of small amounts
of corticosterone in rat plasma, J. Biol. Chem.
231 (1958) 695.

VIII. LEBENS LAUF

Am 5. Juli 1935 wurde ich als Sohn des Berufsschuldirektors Ernst Kopp und seiner Ehefrau Elisabeth Kopp, geb. Conrad, in Rockenhausen/Pfalz geboren.

Ich besuchte wegen der Kriegsereignisse verschiedene Schulen in Lothringen und im Saarland und legte Ostern 1954 in Kaiserslautern/Pfalz am Naturwissenschaftlichen Gymnasium die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1954 begann ich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz das Medizinstudium, das ich nach mehreren Auslandssemestern im Herbst 1961 an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main mit der ärztlichen Prüfung abgeschlossen habe.

Meine akademischen Lehrer waren:

Mainz:

Prof. Dr. A. Dabelow (Anatomie), Prof. Dr. Dr. P. Diepgen (Geschichte der Medizin), Prof. Dr. K. Höhn (Botanik), Prof. Dr. G. Klages (Physik), Prof. Dr. M. Leiner (Zoologie), Prof. Dr. H. Mislin (Zoologie), Prof. Dr. Fr. Straßmann (Chemie).

Paris:

Prof. A. Bargeton (Physiologie), Prof. M. Bulliard (Histologie), Prof. E. Cordier (Anatomie), Prof. P. Debeyre (Anatomie), Prof. A. Djourno (Physik), Prof. O. Dognon (Physik), Prof. A. Giroud (Embryologie), Prof. J. Gosset (Chirurgie), Prof. R. Jayle (Chemie), Prof. A. Lemaire (Innere Medizin), Prof. P. Polonovski (Chemie), Prof. R. Thuillant (Physiologie).

Saarland-Universität:

Prof. Dr. R. Ammon (Phys. Chemie), Prof. C. Arnal (Botanik), Prof. J. Besson (Chemie), Prof. Dr. J. von Boros (Innere Medizin), Prof. F. Doenecke (Innere Medizin), Prof. J. Dubois (Chemie), Prof. H. Franken (Gynäkologie), Prof. Dr. H. Gärtner (Hygiene), Prof. R. Guillien (Physik), Prof. R. Husson (Biologie), Prof. G. Koller (Zoologie), Prof. Dr. H. Limburg (Gynäkologie), Prof. Dr. H. Lüdeke (Chirurgie), Prof. M. Maue (Physik), Prof. Dr. J.B. Mayer (Pädiatrie), Prof. Dr. A. Pallot (Histologie), Prof. E. Rolshoven (Anatomie), Prof. W. Rotter (Pathologie), Prof. J. Roucayrol (Physik), Prof. R. Stämpfli (Physiologie).

Aberdeen/Schottland:

Prof. Sir David Campbell (Pharmakologie), Prof. A. Mc. Donald (Bakteriologie), Prof. H. Fullerton (Innere Medizin), Prof. A.M. Rennie (Orthopädie), Prof. W.C. Wilson (Chirurgie), Prof. P.S. Young (Pathologie).

Frankfurt am Main:

Prof. Dr. W. Artelt (Geschichte der Medizin), Prof. Dr. W. Amelung (Naturheilkunde), Prof. Dr. H. Betke (Arbeitsmedizin), Prof. Dr. H.G. Boenninghaus (Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde), Priv. Doz. Dr. P. Christ (Innere Medizin), Prof. Dr. R. Frowein (Neurologie), Prof. Dr. R. Geißendörfer (Chirurgie), Prof. Dr. E. Güntz (Orthopädie), Prof. Dr. R. Heintz (Innere Medizin), Prof. Dr. K. Herzberg (Hygiene), Prof. Dr. F. Hoff (Innere Medizin), Prof. Dr. H. Jantz (Medizinische Psychologie), Prof. Dr. G. Kahlau (Pathologie), Prof. Dr. H. Kühne (Chirurgie), Prof. Dr. E. Landes (Dermatologie), Prof. Dr. W. A. Lieb (Augenheilkunde), Prof. Dr. H. Martin (Innere Medizin), Prof. Dr. R. Mittermaier (Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde), Prof. Dr. E. F. Pfeiffer (Innere Medizin), Prof. Dr. K. L. Radenbach

(Innere Medizin), Prof. Dr. Dr. B. Rajewsky (Medizinische Strahlenkunde), Prof. Dr. J. von Reckow (Zahnheilkunde), Prof. Dr. W. Rotter (Pathologie), Prof. Dr. B. de Rudder (Kinderheilkunde), Prof. Dr. W. Sandritter (Pathologie), Priv. Doz. Dr. K. Schöffling (Innere Medizin), Prof. Dr. W. Schrade (Innere Medizin), Prof. Dr. H.-J. Schümann (Pharmakologie), Prof. Dr. D. Starck (Anatomie), Prof. Dr. F. Strnad (Medizinische Strahlenkunde), Prof. Dr. R. Thiel (Augenheilkunde), Prof. Dr. E. Ungeheuer (Chirurgie), Prof. Dr. K. Weiße (Kinderheilkunde), Prof. Dr. F. Wiethold (Gerichtliche Medizin), Priv. Doz. Dr. G. Wilhelm (Kinderheilkunde), Prof. Dr. J. Zutt (Psychiatrie und Neurologie).

Frankfurt am Main, den 1. März 1964

Klaus Kay

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

"Zur Bestimmung kleiner ACTH-Quantitäten mit Hilfe des Corticosteronanstiegs im Nebennierenvenenblut der mit Dexamethason hypophysenblockierten Ratte" in der Abteilung für Klinische Endokrinologie (Leiter: Prof. Dr. med. E. F. Pfeiffer) der I. Medizinischen Universitätsklinik zu Frankfurt am Main (Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff) unter Verwendung von ACTH-Präparaten der Standard-Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt Göttingen, The Upjohn Co. Kalamazoo, Michigan U.S.A. und von Dexamethason der Firma E. Merck AG, Darmstadt, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion vorgelegt. Von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden Abb. 3 und 4 nach Abfassung der Dissertation in der vergleichenden Arbeit: Retiene, K., H. Ditschuneit, M. Fischer, K. Kopp und E.F. Pfeiffer: Corticotropin-Bestimmung anhand des Corticosteron-Anstieges im Nebennierenvenenblut hypophysenblockierter Ratten. Vergleich von Dexamethason-Blockade und Hypophysektomie. Acta Endocrinol. 41 (1962) 211, veröffentlicht.

Frankfurt am Main, den 2. Mai 1964

Klaus KKW

